



Inactivação térmica de diferentes espécies de leveduras de alteração de vinhos

Inês Elisa Carrão Morais

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Viticultura e Enologia

Orientador: Doutor Manuel Malfeito Ferreira

Júri:

PRESIDENTE: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

VOGAIS: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2012

Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de agronomia, sob a orientação do Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira, e só foi possível devido à precisa colaboração de vários elementos.

Gostaria de agradecer a todos aqueles, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira por toda a compreensão demonstrada aos mais diversos níveis, pela sua disponibilidade, pela sua paciência e pelas profícuas discussões ao longo da elaboração da tese, incluindo as provas de vinhos.

À Professora Doutora Catarina Prista, pela disponibilidade em ajudar-me nalgumas partes deste trabalho e no percurso académico na área da microbiologia, enriquecendo-o e completando-o com as suas ideias e conhecimentos.

À Professora Doutora Elizabeth Duarte pela disponibilidade oferecida para poder realizar este trabalho.

A todos os colegas de trabalho, às senhoras que trabalham no Laboratório D.Lena e D.Manuela, à Engenheira Ana Carla Silva, Marie-Christine Morais e ao Guilherme Leandro e à família, pela grande amizade que demonstraram e pela ajuda na realização desta dissertação pois sem eles era-me impossível terminá-la a tempo.

Em especial ao meu pai, Ricardo Morais, pois sem ele este mestrado não teria sido realizado.

Resumo

As leveduras de alteração são uma das principais preocupações em enologia. Neste trabalho fez-se um estudo comparativo da resistência térmica entre estirpes de cinco espécies de leveduras de alteração de vinhos: *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomycodes ludwigii*; *Schizosaccharomyces pombe*; *Zygosaccharomyces bailii*; *Dekkera bruxellensis*. As estirpes foram incubadas em vinho tinto padronizado (etanol 12% (v/v), açúcares < 2g/L e pH=3,5), a quatro temperaturas letais entre 30 e 42°C. Os valores do tempo de redução decimal (D) permitiram determinar o valor de Z para avaliar a resistência térmica de cada espécie. A espécie com maior resistência térmica foi a *Z. bailii* (Z=17,5°C), enquanto as outras apresentaram valores inferiores: 4,2°C (*S. pombe*); 5,9°C (*S. ludwigii*); 5,2°C (*S. cerevisiae*); 7,3°C (*D. bruxellensis*). A estirpe de *D. bruxellensis* apresentou uma gama mais baixa de temperaturas de inativação, entre 30 (D=20,8 min) e 36°C (D=3,1 min).

Calcularam-se as Unidades de Pasteurização à temperatura de 60°C (UP60) e, extrapolaram-se, as UP60 entre 60°C e 90°C, para todas as leveduras. Admitindo uma destruição térmica equivalente a 150UP60, os tempos necessários para inactivar as espécies *S. cerevisiae*, *S. ludwigii* e *S. pombe* a 80°C foram inferiores a 4 segundos. *D. bruxellensis*, necessitou de 16 segundos e *Z. bailii* obteve um tempo anormalmente elevado (644 segundos).

Palavras-Chave: Leveduras de alteração, Inativação Térmica, Valores de D, Valores de Z, Vinho, Unidades de Pasteurização.

Abstract

Wine spoilage yeasts are one of the major concerns of oenology. This work was based on comparative study of thermal resistance on five strains of spoilage yeast species most likely to contaminate wine: *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Zygosaccharomyces bailii*; *Dekkera bruxellensis*. These species were incubated in standard red wine (ethanol 12% (v/v), sugar<2g/L, pH=3,5), of four lethal temperatures between 30°C to 42°C. The values of the decimal reduction time (D) allowed the determination of the Z-values in order to evaluate the thermal resistance of each strain. The specie with the highest thermal resistance was *Z. bailii* (Z=17,5°C), while the others had lower Z-values: 4,2°C (*S. pombe*) 5,9°C (*S. ludwigii*) 5,2°C (*S. cerevisiae*) and 7,3°C (*D. bruxellensis*). The strain *D. bruxellensis* became inactive at lower temperatures, from 30°C (D=20,8 min) and 36°C (D=3,1 min).

With the D values, the Pasteurization Units were calculated at a temperature of 60°C (UP60) and, by extrapolation, the UP60 between 60 and 90°C for all yeasts was estimated. Assuming a thermal destruction equivalent of 150UP60, the time required to inactivate the species *S. cerevisiae*, *S. ludwigii* and *S. pombe* at 80°C was less than 4 seconds. *D. bruxellensis* was inactivated in 16 seconds and the most resistant strain, *Z. bailii*, required an atypically high time to inactivate (644 seconds).

Keywords: Spoilage Yeasts, Thermal Inactivation, D-values, Z-Values, Wine, Pasteurization Units.

Extended Abstract

Wine spoilage yeasts are one of the major concerns of the modern oenology. The most common consequences are: veil in stored wines, turbidity, sediments and gas production in bottled wines.

With the change of consumer demand regarding product quality, becomes necessary to find alternative technological processes which do not involve the use of chemicals to treat wine contamination. In order to search for an efficient alternative to inactivate spoilage yeasts via physical methods, it is important to further develop thermal studies, which use lower temperatures than the pasteurization process, and could completely put aside the use of chemical additives.

On this line of thought, this work was based on the comparative study of thermal resistance of five spoilage yeast strains most likely to contaminate wine: *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 (causing refermentations and producing medicinal odors); *Saccharomycodes ludwigii* ISA 1108 (causing refermentations and producing sediments), *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190 (producing sediments), *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270 (refermentations) and *Dekkera bruxellensis* ISA 2211 (producing 4-ethylphenol causing sweat of horse odor). These strains were incubated in standard red wine (ethanol 12% (v/v), sugar < 2g / L, pH=3,5), at four lethal temperatures between 30°C to 42°C and the viability (expressed in survival %) was determined. The D-values were estimated from the $1/|\text{slope}|$. As expected the D-values decreased as the temperatures increased. The values of decimal reduction time (D) obtained allowed the determination of the thermal resistance of each strain based on the Z-values. The strain with the highest thermal resistance was *Z. bailii* (Z=17,5°C), while the other strains had lower Z-values: 4,2°C (*S. pombe*), 5,9°C (*S. ludwigii*), 5,2°C (*S. cerevisiae*) and 7,3°C (*D. bruxellensis*). The strain *D. bruxellensis* became inactive at lower temperatures, from 30°C (D=20,8 min) and 36°C (D=3,1 min).

The D-values and Z-values calculated allow defining technological parameters of time and temperature, which can be used for treating wine against spoilage yeasts. Therefore the D-values for 60°C were estimated, for all yeasts. With these values and knowing that the pasteurization eliminates 10^6 microorganisms, the inactivation time was determined as being around 1 minute. For the yeasts *Z. bailii* and *D. bruxellensis* the Z-value was higher than expected (Z>5), so the D-value at 60°C calculated was higher than expected. Using these values and a coefficient for each Z-value, an informative table of PU (pasteurization units) was made with temperatures between 60°C and 90°C and the time required for inactivation of 150UP60 between the temperatures of 60°C and 70°C.

Assuming a thermal destruction equivalent to 150UP60 (number of UP necessary for the inactivation of microorganisms in wine industry), the time required to inactivate the species *S. cerevisiae*, *S. ludwigii* and *S. pombe* at 80°C was less than 4 seconds. *D. bruxellensis* inactivated in 16 seconds and the most resistant strain, *Z. baillii*, required an atypically high time of 644 seconds to inactivate.

Future studies should assess the effect of the thermal process on the composition (physicochemical and organoleptic) of wine and on the thermal resistance of the microorganisms, since it is possible that both composition and resistance of microorganisms can fluctuate depending on ethanol concentrations, pH (white wines, more acidic), sugar concentrations (sweet wines and liqueurs) and the quantities of SO₂.

Índice

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Abreviaturas.....	iii
1. Introdução.....	1
1.1. Introdução Geral	1
1.2. Leveduras de alteração.....	2
1.2.1. Taxonomia e morfologia	2
1.2.2. Alterações físico-químicas e sensoriais no vinho.....	4
1.2.3. Ecologia e disseminação das leveduras de contaminação	7
1.2.4. Níveis aceitáveis de leveduras em vinhos	9
1.3. Termomicrobiologia	9
1.3.1. Efeito do calor na viabilidade dos microrganismos.....	9
1.3.2. Cinética de morte térmica	10
1.3.3. Factores que influenciam os valores da temperatura de inactivação	12
1.3.4. Efeitos do calor nas características físico-químicas do vinho.....	14
1.3.5. Tratamentos alternativos usados na inactivação de leveduras	14
1.3.6. Tratamentos térmicos - Pasteurização.....	14
1.3.7. O efeito da temperatura sobre os microrganismos – modo de o exprimir.....	15
1.4. Objectivos do trabalho	20
2. Material e Métodos	21
2.1. Microrganismos.....	21

2.2.	Condições de pré-incubação e de crescimento e manutenção das culturas.....	21
2.2.1.	Condições do inóculo	21
2.2.2.	Meios de cultura	22
2.3.	Quantificação da morte celular	22
2.3.1.	Medição da densidade populacional	22
2.3.2.	Determinação do número Total de células.....	23
2.3.3.	Taxa específica de morte térmica (μ_d), tempo de redução decimal (D) e curva de morte térmica (Z-Coeficiente angular)	23
2.3.4.	Determinação das células viáveis.....	23
2.4.	Cinética de morte celular	23
2.4.1.	Ensaio de Morte Térmica	23
2.5.	Unidades de Pasteurização	24
2.5.1.	Extrapolção do valor de D para a temperatura de 60°C	24
2.5.2.	Cálculo do coeficiente para determinar as UP60 entre 60 e 90°C.....	24
3.	Resultados e Discussão	26
3.1.	Determinação dos valores de D	27
3.2.	Determinação do valor de Z	32
3.3.	Determinação dos valores de D_{60} , $6D_{60}$, UP60 e 150UP60.....	34
4.	Conclusões.....	38
5.	Bibliografia.....	39
5.	Anexos	43

Lista de Figuras

Figura 1.1. Tipos mais frequentes de curvas de sobrevivência celular obtidas a temperaturas letais.....	11
Figura 1.2. Curva de Sobrevivência, com redução de microrganismos (10^n) ao longo do tempo	17
Figura 1.3. Curva do tempo de morte Térmica, de coeficiente angular- Z	18
 Figura 2. 1. Esquema de montagem do ensaio experimental para a realização de curvas de sobrevivência	25
 Figura 3.1. Inativação térmica, na estirpe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000, em vinho tinto.	27
Figura 3.2. Inativação térmica, na estirpe <i>Saccharomyces ludwigii</i> ISA 1108, em vinho tinto	28
Figura 3.3. Inativação térmica, na estirpe <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190, em vinho tinto	29
Figura 3.4. Curva de sobrevivência de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270, em vinho tinto	29
Figura 3.5. Inativação térmica, na estirpe <i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211, em vinho tinto ..	31
Figura 3.6. Curvas de morte térmica, das cinco estirpes de leveduras estudadas, em função da temperatura, em vinho tinto	32

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Morfologia das células vegetativas das leveduras de alteração em vinhos e suas imagens ao microscópio óptico.	3
Tabela 1.2. Exemplos de termorresistência de leveduras, classificadas por ordem decrescente.....	18
Tabela 1.3. Exemplos de termorresistência de células vegetativas e ascósporos, em refrigerantes a uma temperatura de 60°C.....	18
Tabela 1.4. Exemplos de valores de D e valor de Z em vinho (pH=3,6, 12% de etanol).....	19
Tabela 2.1. Leveduras de alteração e suas estirpes (códigos) usadas no trabalho experimental.....	21
Tabela 3.1. Tempos de redução Decimal (D) e valores de Z determinados em vinho Tinto (pH=3,5), na fase exponencial de crescimento.....	33
Tabela 3.2. Tempos de redução Decimal (D) a uma temperatura de 60°C, em uma e em seis potências de dez, e coeficientes para o cálculo de UP60 entre as temperaturas de 60°C e 90°C	34
Tabela 3.3. Tempo necessário para atingir uma inactivação de aproximadamente 150UP60 entre as temperaturas de 70°C e 80°C.....	36

Lista de Abreviaturas

Abreviaturas referidas e não explicadas no texto:

GMP's	Good manufacturing practices
Spp	Espécie
SO ₂	Dióxido de Enxofre
a _w	Actividade da água (water activity)
UFC	Unidades formadoras de colónias
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
GYP	Meio com extracto de levedura, peptona e glicose
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
rpm	Rotações por minuto
PYCC	Portugal Yeast Culture Collection
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DMDC	Dicarbonato de Dimetil

1. Introdução

1.1. Introdução Geral

Com a evolução das exigências dos consumidores é necessário encontrar processos tecnológicos no tratamento de contaminações do vinho que não envolvam o uso de compostos químicos.

Os tratamentos pelo calor são cada vez mais usados pois permitem reduzir as doses dos conservantes químicos utilizados, na estabilização microbiológica e conservação dos vinhos.

As leveduras de alteração são conhecidas por provocarem várias transformações a nível sensorial e físico-químico no vinho, sendo importante realçar o conhecimento sobre os melhores tratamentos a aplicar. Normalmente, esta estabilidade microbiana, pode ser atingida através de tratamentos químicos e físicos, nomeadamente tratamentos térmicos (Tristezza *et al.*, 2010).

As doenças do vinho causadas por leveduras são uma das maiores preocupações em enologia moderna. Os efeitos mais comuns são: a formação de véu e a formação de ácido acético e maloláctico, em vinhos armazenados, a turvação, a formação de sedimentos e a produção de gases, em vinhos engarrafados, e, finalmente, aromas e sabores defeituosos em todas as fases da produção de vinhos.

A resistência ao calor por parte dos microrganismos é afectada por um variado número de factores, incluindo a sua resistência intrínseca e factores ambientais, que são importantes durante o crescimento e durante a formação celular ou/e de esporos, e durante o tempo de aquecimento (Jermini e Schmidt-Lorenz, 1987) logo, depende das propriedades dos vinhos, como o conteúdo de açúcar, álcool e pH.

O uso da temperatura na inactivação destes microrganismos será uma das hipóteses mais promissoras, não descurando no entanto a possibilidade de provocar alterações na qualidade do vinho. Realça-se, então o estudo da morte das leveduras, pelas variáveis tempo e temperatura, para se determinar a melhor temperatura e tempo de morte, de forma a destruir toda e qualquer contaminação microbiológica. O processo não deverá alterar a composição físico-química e sensorial do vinho.

Durante cem anos a indústria alimentar assumiu que, a penetração do calor nos produtos, durante o processamento, era uniforme e que a inactivação térmica, seguia

uma cinética linear-logarítmica, durante a estimativa da eficiência de um tratamento térmico (Bermúdez-Aguirre e Corradini, 2012).

Surpreendentemente, em contraste com outras bebidas de alta produção, os tratamentos térmico raramente são usados na indústria do vinho para inactivação microbiológica. Em particular, estes tratamentos deveriam ser incluídos, de uma forma corrente, principalmente em vinhos com açúcar residual. Os microrganismos do vinho são sensíveis à temperatura, sendo assim, temperaturas relativamente médias são suficientes para assegurar a esterilização do vinho. Contudo, os enólogos estão geralmente relutantes com o uso de tratamentos térmicos, pois afirmam haver deterioramento na qualidade organoléptica e longevidade do vinho (Malfeito-Ferreira, 2010).

O estabelecimento de níveis aceitáveis de microrganismos no produto final é uma preocupação de muitas indústrias. O objectivo dos técnicos é cumprir com os níveis que são atingíveis, dentro das condições práticas da sua indústria, assegurando a estabilidade do produto durante o seu tempo de prateleira. Como tal, a manutenção de elevados padrões de higiene durante as várias etapas da produção de vinho é essencial para evitar a contaminação do vinho (Tristezza *et al.*, 2010).

1.2. Leveduras de alteração

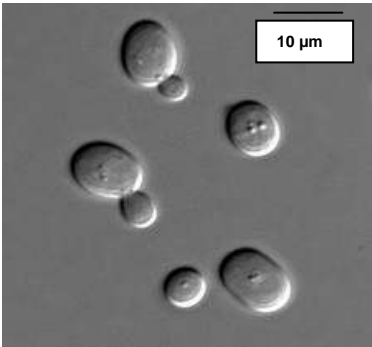
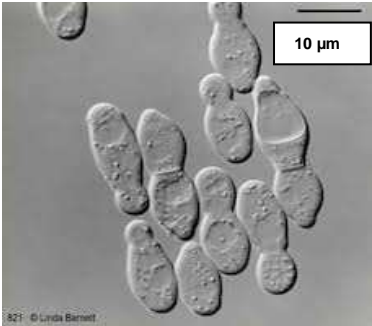
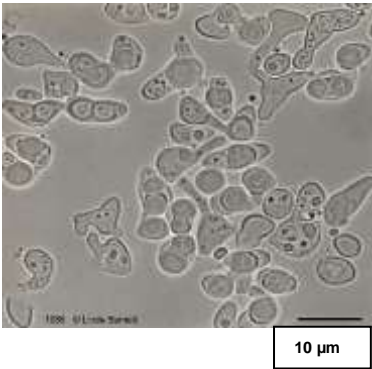
1.2.1. Taxonomia e morfologia

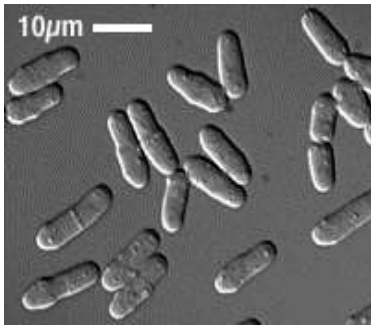

As leveduras associadas a mostos e a vinhos podem ser esporogéneas ou não esporogéneas (forma imperfeita). As primeiras produzem ascósporos e as segundas não. Dentro das leveduras esporogéneas existem as que pertencem à classe taxonómica *Ascomycota*, dentro da ordem *Endomycetas* e incluem as famílias *Spermophoraceae* e *Saccharomycetaceae*. As últimas incluem as subfamílias: *Schizosaccharomycetoideae*, *Nadsonioideae*, *Lipomycetoideae* e *Saccharomycetoideae* (Delfini e Formica, 2001).

A primeira subfamília, contém o género *Schizosacchaeomyces*, a segunda contém os géneros *Hanseniaspora* e *Saccharomycodes*, e a terceira o género *Lypomyces*. A família *Saccharomycetaceae*, inclui os géneros mais importantes em enologia: o género *Saccharomyces* assim como o *Zygosaccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*. A ordem *Saccharomycetales* também inclui uma levedura importante, *Brettanomyces* (forma imperfeita de *Dekkera*) (Delfini e Formica, 2001).

As leveduras assumem morfologias diferentes consoante a etapa do seu ciclo de vida. As morfologias das leveduras usadas neste estudo estão caracterizadas e representadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Morfologia das células vegetativas das leveduras de alteração em vinhos e suas imagens ao microscópio óptico.

Levedura	Morfologia das células vegetativas (Forma)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oval 
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Forma de limão ou “sola de sapato” 
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Esferoidal 

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cilíndrica ou em “forma de pepino” 
<i>Dekkera bruxellensis (Brettanomyces)</i>	Ogival 

1.2.2. Alterações físico-químicas e sensoriais no vinho

A identificação de leveduras de alteração, nos vinhos, tem sido de elevada importância para os enólogos avaliarem os riscos de futuras contaminações (Toit e Pretorius, 2000).

De acordo com a base de dados da colecção de culturas de leveduras da CBS (www.cbs.knaw.nl/collections) existem descobertas mais de 900 espécies. Destas, cerca de um quarto são contaminantes, mais ou menos frequentes, dos alimentos ou bebidas, mas apenas cerca de uma dezena tem um papel relevante na sua alteração. As leveduras responsáveis por modificações indesejáveis detectadas visualmente, ou organolepticamente, são denominadas *leveduras de alteração*. No entanto, para os técnicos, este conceito só se aplica a leveduras capazes de alterar os alimentos produzidos, de acordo com os padrões de boas práticas fabris (GMPs) (Pitt e Hocking, 1985), não obstante a subjectividade destas práticas. A definição de alteração microbiana nem sempre é fácil, especialmente em alimentos fermentados, como o vinho, onde os metabolitos produzidos contribuem para o aroma e sabor. Por outro lado, em bebidas fermentadas e particularmente em vinhos, o conceito de levedura de alteração tem um significado mais complexo, do que

tem em bebidas não fermentadas, onde qualquer levedura, capaz de alterar as suas características organolépticas é considerada de alteração (Malfeito-Ferreira, 2010).

Em vinificação a actividade das leveduras é essencial na fermentação, onde existe um elevado número de espécies, bem como de bactérias lácticas e acéticas, pelo que é muito difícil diferenciar a actividade de fermentação da de alteração. Assim, compreende-se que não seja habitual o despiste destas leveduras durante a fermentação vinária. Pelo contrário, durante a armazenagem e engarrafamento, o controlo microbiológico de leveduras de alteração, é prática corrente (Malfeito-Ferreira, 2010).

Em face do exposto as espécies, consideradas como de alteração, variam de acordo com os autores: Deak e Beuchat (1996) consideraram 39 espécies de leveduras contaminantes dos vinhos, mas um número muito inferior de leveduras de alteração. Sponholz (1992) descreveu os problemas resultantes da produção de ésteres e formação de véu por *Hansenula*, *Candida* e *Pichia*, embora tenha considerado *Zygosaccharomyces bailii* e *Brettanomyces* spp. como as mais perigosas. Kunkee e Bisson (1993), definiram 4 grupos de leveduras de alteração, com base no grau de perigosidade: i) leveduras de fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*), capazes de refermentar vinhos doces; ii) *Z. bailii* provoca refermentações no vinho; iii) leveduras de véu (*Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metchnikowia*, *Debaryomyces*) e iv) *Brettanomyces* spp., produz 4-etilfenol. A importância de *Z. bailii* e *Brettanomyces* spp. também foi reconhecida por Boulton *et al.* (1996) e Fugelsang (1997), que descreveram as suas actividades de alteração pormenorizadamente. *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomycodes ludwigii*, apesar de serem leveduras de alteração muito perigosas (Thomas, 1993), são bastante raras, assumindo uma menor importância (Kunkee e Bisson, 1993, Fugelsang, 1997).

O aumento da exigência dos consumidores também alargou a gama de defeitos ou diminuiu a tolerância em relação a aspectos, que não eram anteriormente considerados, sendo estes, maioritariamente devidos a leveduras (e. g. ligeira turvação em vinhos engarrafados, “suor de cavalo”, acetato de etilo). O melhor exemplo deste aumento da importância das leveduras, na alteração de vinhos, é ilustrado pelos géneros *Dekkera/Brettanomyces* spp. Um exemplo paradigmático desta situação ocorre na indústria dos vinhos, com a produção de 4-etilfenol por parte destas. Nos vinhos tintos, só se considera a existência de alteração, quando o teor de 4-etilfenol é superior a cerca de 620 µg/l (Chatonnet *et al.*, 1992, 1993). Para níveis inferiores a 400 µg/l, este composto pode contribuir favoravelmente para a complexidade do vinho, através de notas de especiarias, couro ou caça, apreciadas por muitos consumidores. Acima de 620 µg/L os vinhos são claramente penalizados por alguns consumidores, embora

continuam a merecer as preferências de muitos outros. O 4-etilfenol pode ser usado como indicador químico ou sensorial na detecção de *Dekkera/Brettanomyces* spp. (Boulton *et al.*, 1996). Quer por via cromatográfica, quer por prova organoléptica (odor a suor de cavalo), a sua quantificação é essencial no controlo destas leveduras. Assim sendo, a espécie *D. bruxellensis* é actualmente considerada como a causa principal de alteração de vinhos, particularmente em tintos de elevada qualidade e grande valor comercial, envelhecidos em barricas de carvalho, sendo responsável por elevadas perdas económicas (Boulton *et al.*, 1996).

A contaminação mais perigosa dos vinhos é devida à espécie *Saccharomyces ludwigii*, esta levedura resiste a teores elevados de SO₂ livre na ordem de 100mg/L. Sendo rara nos mostos em fermentação, a contaminação ocorre, normalmente, a partir de mostos amuados pelo SO₂. Estas contaminações tornam-se visíveis em vinhos engarrafados, dando origem a um sedimento de colónias de leveduras, de cor castanha clara. Invertendo a garrafa, verifica-se que se trata de um depósito leve que cai muito lentamente para o gargalo da garrafa. Esta levedura produz altos níveis de acetaldeído e tem sido isolada como uma massa floculenta (Toit e Pretorius, 2000). O combate a esta levedura implica uma cuidada desinfecção dos depósitos de alimentação da linha de engarrafamento, dos filtros, e sobretudo, da enchedora (Cardoso, 2005). *S. ludwigii*, encontrada em vinhos engarrafados, também é altamente tolerante ao etanol e sorbatos (Toit e Pretorius, 2000).

A espécie *Zygosaccharomyces* é osmofílica, ou seja, tem a capacidade de crescer em altas concentrações de açúcar e de fermentar completamente o mosto. Esta é altamente resistente a conservantes do vinho (SO₂, ácido sórbico e benzóico) e também possui uma alta tolerância ao etanol, mas baixa tolerância a pH ácido (<2,0), sendo assim, uma levedura difícil de inactivar, podendo provocar a refermentação do vinho. Esta levedura pode levar a um aumento dos ácidos acético e succínico, a um decréscimo do ácido L-málico, provocando uma redução na acidez total e uma alteração na concentração de ésteres (Toit e Pretorius, 2000).

No que respeita às espécies *D. bruxellensis*, *Z. bailii* e *S. cerevisiae*, consideram-se leveduras de alteração *sensu stricto* e como das mais frequentemente isoladas de vinhos alterados. *S. cerevisiae* parece ser mais perigosa do que o indicado pelos autores anteriores, uma vez que algumas estirpes, foram isoladas de vinhos brancos secos e parecem mais perigosas do que *Z. bailii*, devido à sua maior tolerância ao ácido sórbico e ao sulfuroso, para valores elevados de etanol (Malfeito-Ferreira *et al.*, 1989). Adicionalmente, algumas estirpes de *S. cerevisiae* estão hoje frequentemente

associadas à refermentação de vinhos tintos, devido à presença de teores residuais de açúcares fermentescíveis, em vinhos de elevado teor de etanol (>13 % v/v) (Malfeito-Ferreira, 2010). No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo de contaminação apenas quando é encontrado no “sítio errado na altura errada”, podendo causar refermentações. Esta pode produzir H₂S e odores medicinais, com conotação negativa, devido à formação de fenóis voláteis (vinilfenóis) e devido à descarboxilação dos ácidos hidroxicinâmicos libertados por enzimas pectolíticas comerciais (usadas na clarificação do vinho) (Malfeito-Ferreira, 2010).

Schizosaccharomyces pombe está associada a alterações no vinho, quando cresce dentro da garrafa, provocando um sedimento no fundo da mesma (Toit e Pretorius, 2000, Kunkee e Bissou, 1993, Fugelsang, 1997).

1.2.3. Ecologia e disseminação das leveduras de contaminação

O ambiente, relacionado com a produção de vinhos, pode ser dividido em duas fases principais: a vinha, que é um ecossistema natural adaptado pelo Homem e fortemente influenciado pelas práticas culturais, e a adega, ambiente produzido pelo Homem, necessário à fermentação, armazenamento e engarrafamento de vinhos.

O conhecimento profundo destes dois ecossistemas é essencial para determinar a origem das leveduras de alteração, as vias de contaminação, os pontos críticos de infecção e o seu controlo. No caso das leveduras estudadas, os pontos críticos de contaminação são a adega e a linha de engarrafamento.

Adega

As espécies, consideradas como as mais perigosas para os vinhos (e.g. *Dekkera/Brettanomyces* spp., *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomycodes ludwigii*), raramente são detectadas em estudos de ecologia microbiana realizados em adegas. Apesar dos trabalhos clássicos de van der Walt e van der Kerken (1958, 1961), em *Brettanomyces* ssp., Rankine e Pilone (1973) e Minarik (1983), em *Z. bailii*, e Peynaud e Domerc (1955), em *S. ludwigii*, terem demonstrado a sua presença como contaminantes de adega, a maioria dos resultados da literatura aponta para a sua baixa incidência, pelo que não são consideradas como contaminantes típicas de adega. Com efeito, trabalhos recentes têm demonstrado o isolamento de *Dekkera/Brettanomyces* em uvas na adega, na linha de processamento dos mostos (Alguacil *et al.*, 1998) e no ar do ambiente dos hangares de esmagamento, armazenagem e de engarrafamento (Connel *et al.*, 2002). As leveduras do género *Zygosaccharomyces*, em particular *Z. bailii*, são raras em uvas sãs no entanto, a sua

presença é conhecida em adegas que produzem vinhos doces ou espumantes utilizando mosto concentrado ou sulfitado (Rankine e Pilone, 1973, Neradt, 1982, Minarik, 1983, Wiumet *al.*, 1990). O facto de estas leveduras serem particularmente resistentes aos conservantes, nomeadamente *Z. bailii* (Thomas e Davenport, 1985), *Z. bisporus* e *Z. rouxii* (Esch, 1992), significa que a adição de doses subletais de conservantes aumenta a sua resistência e capacidade de proliferação. Assim, são boas práticas fabris, adicionar os conservantes mesmo antes do engarrafamento e limitar a circulação de mosto concentrado a bombas e tubagens específicas.

Saccharomyces ludwigii também é uma levedura perigosa, mas considerada pouco frequente em adegas. É muito tolerante ao sulfuroso, e pode ser encontrada em adegas onde se utiliza em excesso este conservante e onde se manipula mosto amuado. Thomas (1993) definiu esta espécie como “o pesadelo dos enólogos” pela dificuldade que existe em erradicá-la de vinhos a granel e do ambiente de adegas.

Linha de engarrafamento

Em termos microbiológicos, o engarrafamento de vinhos, fase pós fermentativa, é uma operação altamente crítica, pois, com excepção do enchimento a quente, é a última fonte de contaminação antes do vinho sair para o mercado (Toit e Pretorius, 2000). O grau de contaminação depende do tipo de vinho. Em primeiro lugar, o facto de ser tinto ou branco, determina a percepção por parte dos consumidores da alteração devido a turvações e sedimentos. Desta forma, é corrente considerar os brancos como mais susceptíveis à alteração, embora Deak e Reichart (1992) afirmem que os brancos secos são menos susceptíveis, que os tintos secos. A microflora é, em regra, diferente da de outros sítios da adegas, prevalecendo as leveduras altamente fermentativas e resistentes a conservantes químicos (Rankine e Pilone, 1973, Donnelly, 1977, Poulard, 1978).

Em vinhos doces, com mosto concentrado, e com elevados teores de sulfuroso e sorbato, a flora é dominada por espécies altamente resistentes aos conservantes e ao baixo a_w , como *Z. bailii*, *S. cerevisiae* e *S. ludwigii* (Rankine e Pilone, 1973, Minarik, 1983, Fleet, 1992). Doses subletais de sulfuroso (Delfini, 1988) e/ou sorbato (Warth, 1986) contribuem para o enriquecimento da flora de adegas nestas espécies (pois aumentam as resistências da levedura), em particular, nas linhas de engarrafamento. O mesmo se aplica ao uso de mosto concentrado, fonte de *Zygosaccharomyces* spp. e outras espécies perigosas (Rankine e Pilone, 1973, Thomas e Davenport, 1985, Wium *et al.*, 1990).

Sendo assim, os factores críticos no engarrafamento são boas condições sanitárias na adega, ausência de oxigénio e uma dosagem correcta de agentes antimicrobianos para assegurar um produto estável (Toit e Pretorius, 2000).

A manutenção de padrões elevados de higienização, durante as várias etapas de produção de vinho, torna-se essencial para prevenir a sua contaminação. A selecção dos detergentes e desinfectantes, na indústria alimentar, depende de vários factores, como a eficácia na remoção de um largo espectro de microrganismos, na segurança no seu manuseamento, ou eliminação de resíduos do agente activo, o seu nível de corrosão para as superfícies e o seu efeito na qualidade sensorial do produto (Tristezza *et al.*, 2010).

1.2.4. Níveis aceitáveis de leveduras em vinhos

O Office International de la Vigne et du Vin (OIV) não define níveis máximos de microrganismos em vinhos. A única condição é que o vinho deve ser límpido, o que equivale a possuir no máximo 10^4 - 10^5 UFC/mL (em brancos) para microrganismos que produzem sedimentos finos e menos de 10^2 - 10^3 UFC/mL, para os que produzem sedimentos floculentos.

1.3. Termomicrobiologia

1.3.1. Efeito do calor na viabilidade dos microrganismos

A temperatura tem uma influência considerável na vida dos microrganismos. À medida que a temperatura aumenta progressivamente, afastando-se da temperatura ideal de crescimento (baixa ou alta), a actividade metabólica dos microrganismos e a sua capacidade de multiplicação fica mais comprometida (Delfini e Formica, 2001).

As temperaturas baixas têm consequências diferentes, comparativamente com as temperaturas altas. Enquanto as temperaturas baixas inibem o crescimento, sem destruir os microrganismos, as temperaturas acima do valor ideal de crescimento podem ter, à partida, um efeito de crescimento benéfico com a aceleração de alguns processos vitais. Todavia, temperaturas altas são altamente destrutivas, porque moléculas como proteínas, ADN e ARN são muito sensíveis às mesmas. Este processo destrutivo é mais evidente e irreversível à medida que as temperaturas letais são atingidas (Delfini e Formica, 2001).

Cada microrganismo tem a sua própria “Temperatura letal” mas pode mudar de espécie para espécie, de acordo com o seu estado fisiológico (célula vegetativa *versus*

esporos) e idade. Por exemplo, células na sua fase exponencial de crescimento são mais sensíveis ao calor, que as células na sua fase estacionária. A temperatura letal indica o nível de resistência de um dado organismo ao calor, neste aspecto, a fase esporulada é o estado fisiológico com o grau de resistência mais elevado ao calor e outros tratamentos antimicrobianos (Delfini e Formica, 2001). Algumas descobertas sugerem que, pelo menos em *Saccharomyces cerevisiae*, os sítios de morte térmica estão localizados dentro da membrana interna da mitocôndria (Van Uden, 1984).

1.3.2. Cinética de morte térmica

Consideremos uma população de células viáveis de microrganismos sujeita à acção de um agente letal, como a temperatura, quando superior à temperatura máxima de crescimento ($T_{m\acute{a}x}$). Ao fim de algum tempo a população começará a morrer, sendo a velocidade da morte função da intensidade do agente letal e das condições ambientais a que as células estão sujeitas. Do ponto de vista prático torna-se evidente a importância do conhecimento de parâmetros que possam quantificar tal fenómeno, conhecidas que são as acções, tanto benéficas como nocivas, de muitos microrganismos. Mas para estudar quantitativamente a morte torna-se indispensável “defini-la”, bem como avaliá-la. Considera-se, geralmente, que uma célula está morta quando perdeu a sua capacidade de reprodução. A avaliação da morte com base nesta definição, ainda que normalmente considerada a melhor, tem inconvenientes, pois só pode ser feita com base nos microrganismos sobreviventes *a posteriori*, após incubação de amostras da população num meio de cultura sólido apropriado^(a), além de envolver um aspecto subjectivo decorrente da escolha do meio de cultura de recuperação e das condições de recuperação (Loureiro, 1984).

(a) Outros métodos existem para avaliar as células viáveis, como a coloração vital, efeitos ópticos, ligação de substâncias indicadoras, etc., que poderão obviar tal inconveniente, embora apresentem muitos outros.

Analisemos agora o que se passa com uma população de células viáveis sujeita à acção de uma temperatura letal. Se representarmos em dois eixos coordenados os logaritmos dos números de células sobreviventes e os tempos de exposição a tal temperatura, poderão obter-se curvas dos tipos representados, esquematicamente, na Figura 1.1:

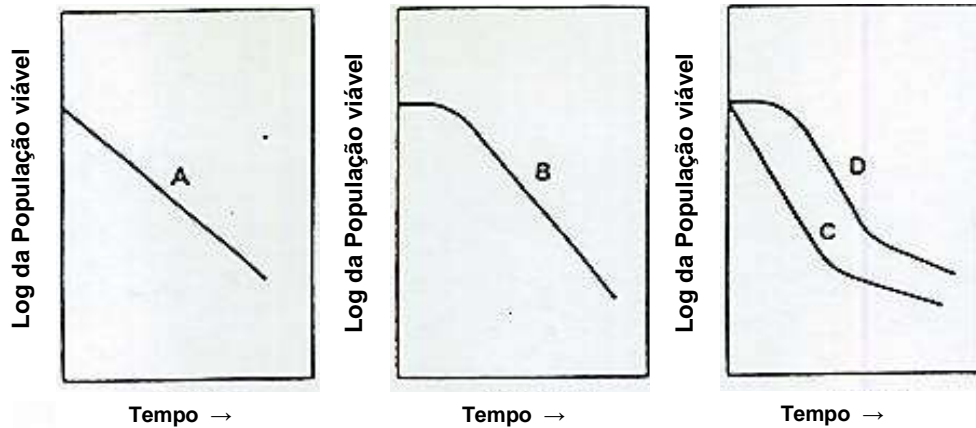


Figura 1. 1. Tipos mais frequentes de curvas de sobrevivência celular obtidas a temperaturas letais (Loureiro,1984).

Segundo a metodologia usada para o crescimento, teremos, para a parte linear das curvas:

$$\ln x_t = \ln x_0 - \mu_m t \quad (\text{equação 1})$$

em que:

x_t = densidade populacional viável no tempo t

x_0 = densidade populacional viável no tempo zero

μ_m = constante de proporcionalidade

Tomando antilogaritmos teremos:

$$x_t = x_0 \cdot e^{-\mu_m t} \quad (\text{equação 2})$$

Diferenciando, virá:

$$\frac{dx}{dt} = -\mu_m x_0 e^{-\mu_m t}$$

que, conjugada com a equação 2 conduz à expressão:

$$- \frac{dx}{dt} = \mu_m \cdot x$$

a qual permite explicitar o sentido físico da constante de proporcionalidade μ_m , designada taxa específica de morte:

$$\mu_m = - \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} \quad (\text{equação 3})$$

A avaliação do número de células mortas (inviáveis) de uma população sujeita a um agente letal é, normalmente feita com base nas células sobreviventes e, por conseguinte, o cálculo da taxa específica de morte faz-se através do coeficiente angular das curvas de sobrevivência. A complementaridade existente entre curvas de morte e de sobrevivência legítima tal critério (Loureiro, 1984).

1.3.3. Factores que influenciam os valores da temperatura de inactivação

Alguns componentes no vinho podem ter um efeito de protecção e aumentar os níveis de resistência ao calor, enquanto outros podem diminuir a resistência ao calor, actuando de forma sinérgica (Delfini e Formica, 2001).

A termorresistência dos microrganismos de um vinho está ligada a quatro tipos de factores (Deveze, 1977): ao microrganismo, à temperatura de crescimento e idade do mesmo, à natureza do vinho (teor em álcool, açúcar, presença de SO₂, etc) (Brugirard e Rochard, 1991). Segundo Henriette e De Jong (1981) os esporos formados pelas leveduras demonstram uma resistência superior ao calor do que as suas células vegetativas, logo os esporos são mais resistentes.

Efeito da concentração de açúcar

Os níveis altos de concentração de açúcar têm um efeito significativo de protecção nas leveduras e nas bactérias. Os açúcares ao ligarem-se à água, causam uma diminuição da água disponível para as actividades microbianas. Ao reduzir esta disponibilidade as células reagem como se estivessem parcialmente desidratadas, uma condição que aumenta a resistência ao calor (Delfini e Formica, 2001).

Efeito do etanol

As concentrações de álcool afectam a resistência térmica dos microrganismos (Delfini e Formica, 2001).

Um aumento na concentração de álcool de 4% para 7% resulta numa redução decimal do tempo necessário para baixar a população de *Saccharomyces cerevisiae* para um décimo da inicial, a uma dada temperatura (Delfini e Formica, 2001). Consequentemente, a concentração de etanol no vinho tem um efeito sinérgico forte nas propriedades destrutivas do calor. Neste aspecto, deve ter-se em consideração os vinhos doces, por exemplo “muscat d’Asti” e espumante de Asti, pois estes têm valores de álcool baixos e níveis de açúcar elevados, sendo consequentemente, dos mais difíceis de estabilizar ao nível dos microrganismos (Leão e Van Uden, 1982, Van Uden, 1985, Sa-Correia e Van Uden, 1986).

Segundo Malfeito-Ferreira (2010), a levedura *S. cerevisiae* é menos sensível ao álcool que *D. bruxellensis* sendo na primeira a concentração máxima para o crescimento de 17% (v/v) e na segunda 15% (v/v), sendo assim, o álcool por si só contribui para um menor crescimento de leveduras com maior sensibilidade ao mesmo.

Efeito dos ácidos fracos

O sinergismo entre ácidos orgânicos e temperatura ocorre produzindo um efeito inibidor potencializado. A faixa de crescimento de *S. cerevisiae* é encurtada de 3-42°C para 19-26°C na presença de 1% (v/v) de ácido acético (Tereza-Ramos e Van Uden *et al.*, 1989). Segundo Pinto *et al.*, experiências realizadas em nesta levedura indicam que o ácido acetico é trinta vezes mais tóxico que o etanol em ralção à viabilidade celular das leveduras, quando associado a temperaturas elevadas de processamento.

Efeito do SO₂

De acordo com alguns estudos, a presença de SO₂ (ex: 25 a 50mg/L) tem uma baixa ou quase nenhuma acção sinérgica na actividade destrutiva do calor nas leveduras. Por exemplo, experiências com *S. cerevisiae* a 49°C, sob concentrações mais elevadas de SO₂, revelaram que não há alterações na morte térmica (Delfini e Formica, 2001, Van Uden, 1984).

1.3.4. Efeitos do calor nas características físico-químicas e sensoriais do vinho

O parâmetro físico-químico onde se obtiveram maiores diferenças foi na estabilidade tartárica, induzindo a instabilidade no vinho pasteurizado. Assim, concluiu-se, que o tratamento térmico não teve uma grande influência nos parâmetros físico-químicos e sensoriais, e por conseguinte na qualidade dos vinhos (Ezequiel, 2010).

A nível sensorial realizaram-se ensaios em Chardonnay e Semillon, sobre alterações provocadas por tratamentos térmicos, a 45°C, durante três semanas e a 90°C, durante alguns minutos. À temperatura de 45°C os efeitos do calor foram significativos enquanto a 90°C não foram encontradas diferenças significativas. No primeiro caso, os vinhos apresentaram um decréscimo no carácter floral e um aumento dos aromas a mel, fumo e amadeirado, características associadas a vinhos envelhecidos (Francis, 1994).

1.3.5. Tratamentos alternativos usados na inactivação de leveduras

As tecnologias convencionais de engarrafamento a quente implicam o uso de temperaturas baixas (não excedendo os 55°C) por um longo período de tempo (25 a 40 minutos), enquanto as de pasteurização envolvem a aplicação de temperaturas entre 60 a 65°C, durante 3 a 5 minutos (Delfini e Formica, 2001).

Os efeitos negativos do calor nas características dos alimentos são consideravelmente reduzidos com o uso de novas tecnologias térmicas. Presentemente, a utilização de: microondas, rádio frequência, aquecimento ôhmico e aquecimento por indução, são as opções que permitem reduzir o aumento da temperatura durante o processo. O uso destas tecnologias depende do tipo de alimento e no objectivo específico a ser atingido (Bermúdez-Aguirre e Corradini, 2012).

Para além destes tratamentos térmicos existem outros alternativos frequentemente citados em literatura: altas pressões hidrostáticas, campos eléctricos pulsados, irradiação, ultra-som e luz ultravioleta (Bermúdez-Aguirre e Corradini, 2012).

1.3.6. Tratamentos térmicos- Pasteurização

Pasteur em 1866 realizou experiências rigorosas colocando as bases científicas conhecidas para o procedimento conhecido como Pasteurização (Brugirard e Rochard, 1991).

A pasteurização é fortemente recomendada para todos os vinhos mesmo com baixa contaminação microbiológica, principalmente quando são para exportação. É um processo benéfico em vinhos com açúcar para evitar refermentações (Brugirard e Rochard,1991).

Unidade de pasteurização (UP)

Pasteur demonstrou que o aquecimento de vinho em garrafas colocadas em banho-maria a um minuto a 60°C é suficiente para a destruição dos microrganismos de alteração, evitando assim quaisquer alterações posteriores nas propriedades do vinho. Considera-se unidade de pasteurização, um aquecimento com duração de 1 minuto a 60°C.

As normas actuais, para não haver alterações nos vinhos, referem como limite menos de 30 microrganismos por litro. A associação de uma grande higiene, do uso adequado de SO₂ e de diferentes processos físicos (ex. destruição térmica) permitem resultados de menos de 30 microrganismos por litro. Um tratamento térmico que assegura a “destruição térmica” de todos os microrganismos e seus esporulados entende-se por esterilização. Como tal a temperatura de pasteurização é geralmente inferior em aproximadamente 10°C à temperatura de destruição térmica para um dado microrganismo (Brugirard e Rochard,1991).

A pasteurização pode reduzir a população microbiana até cinco e seis potências de 10, então quanto maior é a redução da população microbiana na garrafa mais duradoura será a conservação (Brugirard e Rochard,1991).

Técnicas de pasteurização

Pasteurização Flash

A pasteurização flash é uma pasteurização rápida que pode durar entre 2 a 3 segundos a temperaturas elevadas entre 70 e 90°C (Brugirard e Rochard,1991).

Engarrafamento a quente ou Termolização

O vinho é enviado a quente por uma canalização até ao bico da enchedora, sendo a garrafa rolhada imediatamente. O arrefecimento é feito lentamente à temperatura ambiente. A temperatura usada é compreendida entre 45 e 55°C (Brugirard e Rochard,1991).

1.3.7. O efeito da temperatura sobre os microrganismos – modo de o exprimir

A temperatura é, sem dúvida, um dos factores ambientais que mais afecta a actividade dos microrganismos, não só porque os seus mecanismos termoadaptativos (por

exemplo, variação da composição lipídica das membranas) são limitados, mas também porque todas as reacções químicas ocorridas no seu interior estão na sua dependência directa. Não é de estranhar pois, que desde há muito se utilizem os microrganismos como material biológico muito favorável para estudar os efeitos da temperatura sobre as funções vitais dos seres vivos (Loureiro, 1984).

Sendo assim, quando a temperatura é elevada acima da máxima para um crescimento celular, as células são danificados e morrem, pois os seus componentes celulares são destruídos e não podem ser restituídos. Quanto maior a temperatura, maiores os danos causados à célula (Adams e Moss, 1995).

Existem vários índices capazes de traduzir, de uma maneira simples, tais efeitos. São de salientar, principalmente pela sua utilização em termobacteriologia alimentar os seguintes: ponto de morte térmica (TDP- thermal death point), que se pode definir como “A temperatura mínima necessária para destruir em 10 minutos e em condições pré-estabelecidas todas as células (ou esporos) de uma suspensão microbiana”; tempo de morte térmica (TDT- thermal death time) que é “o tempo mínimo necessário para matar, a uma dada temperatura, uma suspensão de células (ou esporos), em condições ambientais pré-estabelecidas”; o tempo de redução decimal (Decimal reduction time), vulgarmente representado por D, definido como “o tempo necessário para reduzir de 90% as células viáveis de uma população microbiana, em condições ambientais pré-fixadas, a uma dada temperatura” encontra-se representado na Figura 1.2. (Loureiro, 1984, Brugirard e Rochard, 1991).

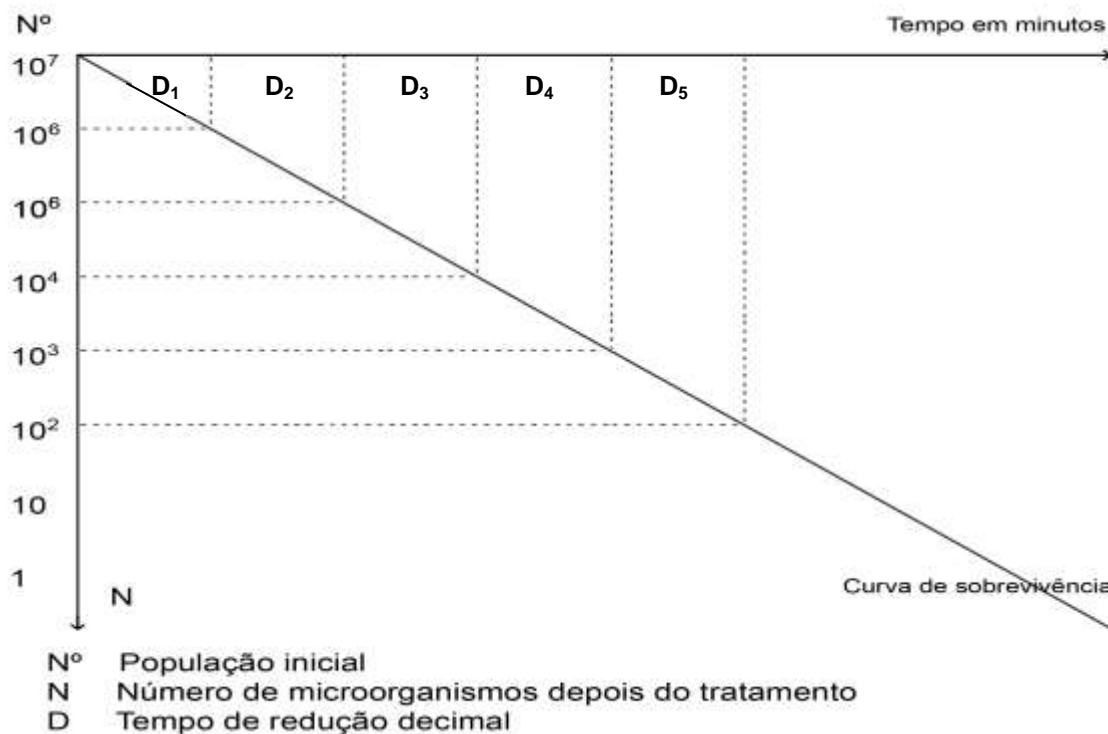


Figura 1. 2. Curva de Sobrevivência, com redução de microrganismos (10^n) ao longo do tempo (Brugirard e Rochard, 1991).

Se construirmos um gráfico tempo por ordenadas os valores dos logaritmos de D , ou os seus múltiplos, e por abcissas as temperaturas a que se sujeitaram as células, obtém-se, geralmente, uma linha recta conhecida por curva do tempo de morte térmica (Thermal Death Curve) ou curva de destruição térmica (thermal destruction curve), representada na figura 1.3., cujo coeficiente angular (Z) traduz a resistência relativa dos microrganismos as diferentes temperaturas letais (Loureiro, 1984). Quanto maior a elevação da temperatura para destruir os microrganismos, menor será o tempo necessário. Existe uma relação logarítmica entre o tempo e a temperatura para a destruição de um dado microrganismo. Então Z representa o aumento da temperatura necessário para reduzir um décimo do seu valor o tempo de aquecimento, actuando sobre uma determinada população microbiana (Brugirard e Rochard, 1991). À medida que a temperatura diminui a taxa específica também diminui. O conhecimento do valor de Z dos organismos é importante se queremos ter em conta o efeito letal de diferentes temperaturas durante o processo de aquecimento. Normalmente, em células vegetativas, o valor de Z é de aproximadamente 5 (Adams e Moss, 1995).

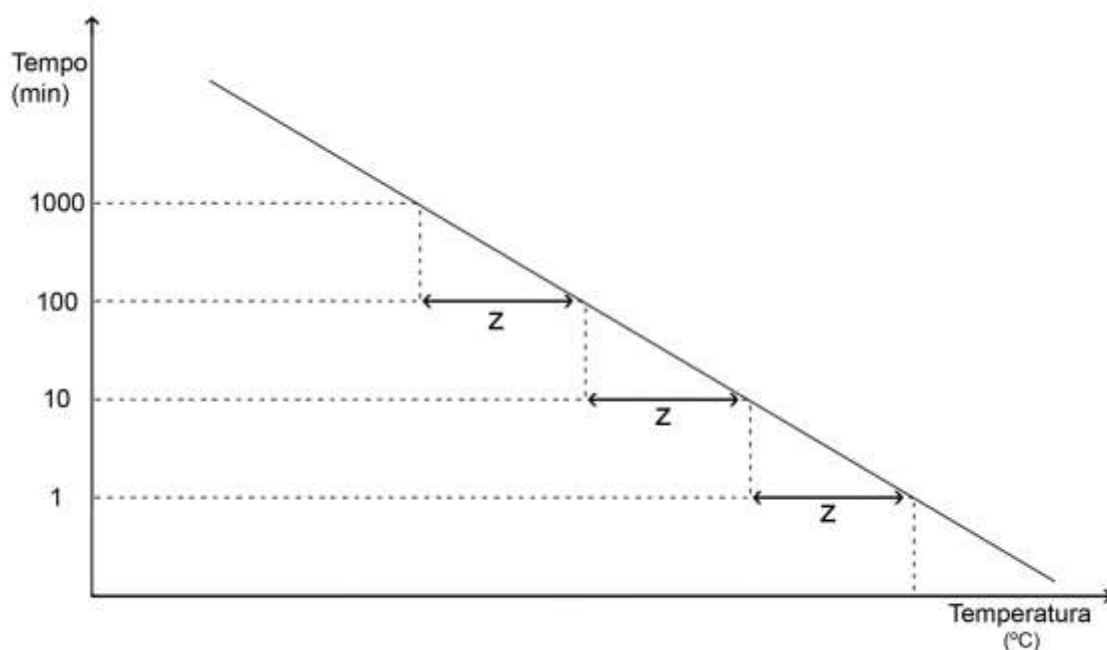


Figura 1. 3. Curva do tempo de morte Térmica, de coeficiente angular- Z (Brugirard e Rochard, 1991).

Segundo Brugirard e Rochard, (1991) as leveduras têm um valor de Z médio compreendido entre 3,5°C e 5,0°C, na sua forma vegetativa, como representado nas tabelas 1.2., 1.3., 1.4..

Tabela 1.1. Exemplos de termorresistência de leveduras, classificadas por ordem decrescente (Deveze, 1977)

Leveduras	Z (°C)	D ₄₀ (min)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,34	65,7
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	4,24	46,1
<i>Saccharomyces bayanus</i>	3,94	8,5
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	3,23	10,8

Tabela 1.3. Exemplos de termorresistência de células vegetativas e ascósporos, em refrigerantes a uma temperatura de 60°C. (Henriette e De Jong, 1981)

Leveduras	Células Vegetativas	Ascósporos
	D ₆₀ (min)	D ₆₀ (min)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,21	18,2 (Z=5,0)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	0,12	14,2 (Z=5,5)

Tabela 1.4. Exemplos de valores de D e valor de Z em vinho (pH=3,6, 12% de etanol) (Couto *et al.*, 2005)

Estirpe	Temperatura (°C)	D (min)	Z (°C)
<i>D. bruxellensis</i> PYCC 4801	32,5	14,8 ($r^2=0,63$)	4,3 ($r^2=0,63$)
	35,0	2,1 ($r^2=0,94$)	
	37,5	1,0 ($r^2=0,96$)	

1.4. Objectivos do trabalho

O presente trabalho foi delineado em função da inexistência de dados actuais sobre a resistência térmica das principais espécies de leveduras de alteração de vinhos. Assim, com o objectivo geral de determinar a resistência de algumas destas espécies utilizaram-se estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000, *Saccharomyces ludwigii* ISA 1108, *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190, *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270 e *Dekkera bruxellensis* ISA 2211 no âmbito do estudo da cinética de morte térmica em relação aos seguintes parâmetros:

- a) Determinar o tempo de redução decimal (D) através do declive da parte linear da curva logarítmica de sobrevivência;
- b) Determinar o valor de Z nas curvas de destruição térmica;
- c) Comparar, com base em valores D e Z, as diferenças de resistência térmica entre as estirpes de leveduras em estudo;
- D) Determinar as UP60 entre as temperaturas 60°C e 90°C e os tempos de tratamento térmico a 150UP60 entre 70°C e 80°C.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos

Este trabalho foi realizado com cinco estirpes provenientes de cinco espécies diferentes de leveduras, conservadas na CISA (coleção do Instituto Superior de Agronomia) do laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Agronomia de origem apresentadas na Tabela 2.1.

As estirpes foram mantidas em meio sólido GYP (Anexo I) no frigorífico e regularmente repicadas.

Tabela 2.1. Leveduras de alteração, suas estirpes (códigos) e origem usadas no trabalho experimental.

Leveduras	Estirpes- Código	Origem
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ISA 1000	Fermento Fermivin, PYCC ^{a)} 4072
<i>Sacharomycodes ludwigii</i>	ISA 1108	PYCC ^{a)} 4227
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA 1190	CECT ^{b)} 1375
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 2270	Uvas com podridão ácida
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ISA 2211	Vinho tinto

a) Portugal Yeast Culture Collection.

b) Colección Española de Cultivos Tipo.

2.2. Condições de pré-incubação e de crescimento e manutenção das culturas

2.2.1. Condições do inóculo

Cultivaram-se as estirpes usando como inóculo culturas provenientes de meio sólido (o mesmo utilizado para manutenção, Anexo I) incubadas em câmara termostatzada a 25°C, durante aproximadamente 24h.

Utilizaram-se balões de Erlenmeyer (esterilizados) de 250mL, com um volume de meio líquido (Anexo I) de 100mL, de modo a permitir o arejamento adequado da cultura e incubou-se com agitação (incubadora orbital a 150rpm) numa câmara termostatzada a 25°C, por um período entre 12h e 48h consoante a estirpe em uso, até atingir uma absorvência a 640nm de aproximadamente 1 (fase exponencial de crescimento).

2.2.2. Meios de cultura

Meio líquido

Nos vários ensaios experimentais utilizou-se, como meio, vinho tinto (composição-Anexo III), previamente esterilizado e padronizado ao qual se retirou o SO₂ até uma concentração inferior a 10mg/L de SO₂ livre; diluiu-se para uma concentração de álcool (etanol) de 12%(v/v) e açúcares <2g/L e ajustou-se o pH para 3,5. Analisou-se novamente o SO₂ livre e total, o álcool %(v/v), concentração de açúcares e pH para confirmar os parâmetros.

Preparação do Vinho

Primeiramente, analisou-se o vinho relativamente ao SO₂ livre e total, ao etanol, aos açúcares e ao pH. Nos casos em que a concentração de SO₂ foi superior a 10mg/L retirou-se com acetaldéido até uma concentração inferior, para assim não interferir com o crescimento das leveduras pois trata-se de um anti-séptico.

De seguida, o álcool acertou-se para 12%(v/v), ou seja, dilui-se o vinho, usando uma solução de ácido tartárico a 5g/L. No acerto do pH para 3,5 usou-se uma solução de HCl a 1M, no caso de se pretender diminuir o valor de pH ou uma solução de NaOH a 1M, para aumentar o valor de pH. No final realizou-se uma esterilização por filtração do vinho, utilizando uma membrana de poro 0,22µm (Millipore), de forma a retirar qualquer tipo de contaminantes do vinho.

Meio sólido

Nos ensaios experimentais, para obter contagens de células (UFC), utilizaram-se placas de Petri (descartáveis) com ±15mL de meio GYP sólido (Anexo I).

2.3. Quantificação da morte celular

2.3.1. Medição da densidade populacional

O crescimento celular de culturas em meio líquido (GYP, Anexo I) acompanhou-se por medição de absorvências a 640nm, num espectrofotómetro (BOECO, MODELS S-20 VIS & S-22 UV/VIS, Alemanha). O branco utilizado foi sempre água desmineralizada.

2.3.2. Determinação do número Total de células

Na determinação do número de células para todos os ensaios de morte realizou-se previamente uma contagem do número de grupos celulares totais numa câmara de contagem de Newbauer (hemocitómetro). Nos casos em que o número total de grupos ultrapassou 300 grupos/ $0,1\text{mm}^3$ procedeu-se à diluição da amostra de forma a obter entre 30-300 grupos/ $0,1\text{mm}^3$ (admitindo que todas as células são viáveis). Se a absorvência lida for aproximadamente 1, por experiência, não foi preciso diluir o meio que contem as células viáveis usadas na experiência.

2.3.3. Taxa específica de morte térmica (μ_d), tempo de redução decimal (D) e curva de morte térmica (Z-Coeficiente angular)

Para as determinações referidas acima calculou-se a percentagem de colónias de cada tempo, tomando o valor médio do tempo zero como 100%. A construção das curvas de sobrevivência e do tempo de redução decimal foram realizados no programa *Origin*.

As taxas específicas de morte térmica foram obtidas por regressão linear dos pontos experimentais localizados na zona linear da representação semilogarítmica da percentagem desobrevivência em função do tempo, tendo por base a equação 3.

O valor de D a uma dada temperatura = $1/\text{módulo do declive da recta}$, e o valor de Z calculou-se a partir da construção de um gráfico, tendo como abcissas as temperaturas usadas, e como ordenadas os valores de D, calculados para as mesmas. Destes pontos retirou-se uma recta em que $Z = 1/\text{módulo do declive da recta}$.

2.3.4. Determinação das células viáveis

O número de células viáveis foi obtido por espalhamento de $100\mu\text{L}$ de suspensão celular em placas de meio rico com a composição descrita no anexo I. As amostras foram retiradas em duplicado.

2.4. Cinética de morte celular

2.4.1. Ensaios de Morte Térmica

Os ensaios experimentais realizados como vista à determinação das taxas específicas de morte térmica, tempo de redução decimal (D) e curva de morte térmica (Z-Coeficiente angular), foram efectuados usando uma montagem apresentada na Figura 2.1.

O inóculo, em fase exponencial, proveio de uma pré-cultura preparada nas condições descritas em 2.3.2.

Após a determinação do número de células para $0,1\text{mm}^3$ com um hemocítmetro, inoculou-se a amostra, de forma a obter uma diluição fraca (aproximadamente 300 UFC/ $0,1\text{cm}^3$) no balão de Erlenmeyer de 500mL, com 200mL de vinho.

A avaliação do número de células viáveis ao longo do tratamento térmico foi obtida por espalhamento de 100 μL suspensão de leveduras num meio GYP sólido, em duplicado (Anexo I).

Colocaram-se as placas numa câmara termostatzada a 25°C a incubar, durante 3 a 5 dias onde se deu o crescimento das leveduras.

2.5. Unidades de Pasteurização

2.5.1. Extrapolação do valor de D para a temperatura de 60°C

Para calcular o valor de D à temperatura de 60°C utilizou-se a equação:

$$\ln \frac{D_1}{D_2} = \frac{T_2 - T_1}{Z}$$

Segundo Pasteur, numa pasteurização, ou seja, em seis reduções de potências de 10 (10^6) de viabilidade o tempo necessário, para inactivar os microrganismos, deverá ser sempre aproximadamente 1 minuto, sendo assim, nos cálculos de unidades de pasteurização (UP) usou-se esta mesma redução.

2.5.2. Cálculo do coeficiente para determinar as UP60 entre 60 e 90°C

Segundo Brugirard e Rochard,1991, a fórmula que se utilizou para calcular o coeficiente é:

$$\text{UP} = \text{coeficiente}^Z$$

Sabendo que para cada aumento de potência de 10 nas UP, corresponde ao coeficiente elevado a um valor de Z (por exemplo: $10 = \text{coeficiente}^5$, para um $Z=5$).

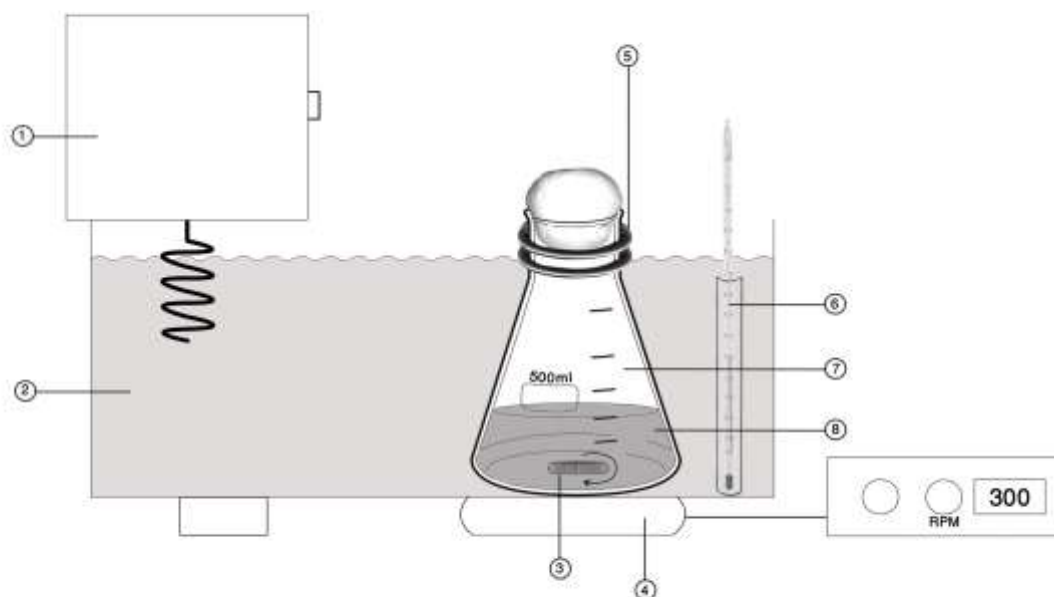


Figura 2.1. Esquema de montagem para o ensaio experimental para a realização de curvas de sobrevivência

Legenda:

1. Termóstato com regulador de temperatura
2. Banho-maria
3. Magneto
4. Agitador Magnético
5. Argolas de Chumbo
6. Termómetro
7. Balão de Erlenmeyer de 500mL
8. 200mL de Vinho Tinto

3. Resultados e Discussão

As leveduras de alteração *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) foram escolhidas neste trabalho experimental por serem as leveduras de alteração de vinho que aparecem mais frequentemente após a sua fermentação (ex: no engarrafamento) e que podem causar impacto sensorial e organoléptico.

A gama de temperaturas para os ensaios de morte térmica foi escolhida com base em duas condições: 1) Como temperaturas mínimas, do ensaio de morte, escolheram-se temperaturas 4°C acima da temperatura máxima de crescimento usado no laboratório para cada estirpe; 2) Como temperaturas máximas escolheram-se temperaturas 8°C acima das temperaturas mínimas, tendo em conta o declive da recta gerado na curva de sobrevivência.

O tratamento dos resultados aparece em detalhe no Anexo III onde estão descritas as contagens feitas em cada temperatura, em quatro temperaturas por levedura, as médias e desvios padrões da % de sobreviventes.

3.1. Determinação dos valores de D

Saccharomyces cerevisiae ISA 1000

A variação da viabilidade celular para diferentes temperaturas na levedura *S. Cerevisiae* ISA 1000, em vinho tinto, encontra-se representada na figura 3.1.

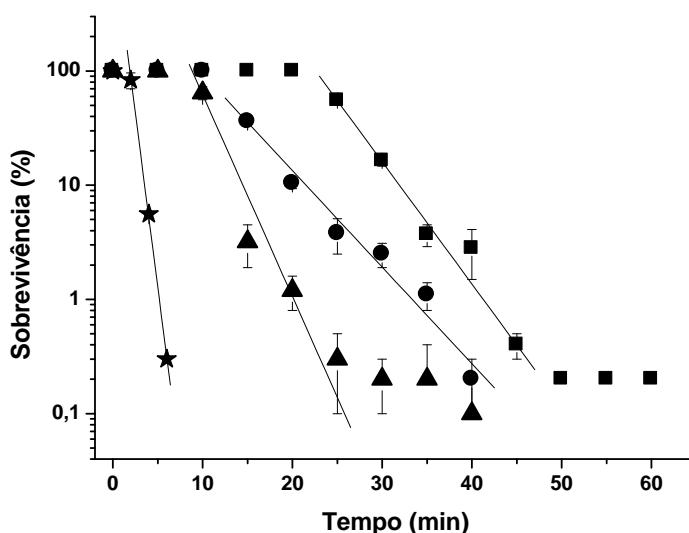


Figura 3. 1. Curva de sobrevivência de *S. cerevisiae* ISA 1000, em vinho tinto (pH=3,5, 12% de etanol) a 34°C (■), 36°C (●), 38°C (▲) e 40°C (★).

Observou-se uma fase inicial sem perda de viabilidade, tanto mais reduzida quanto maior a temperatura. Após esta fase o decréscimo de viabilidade ocorreu de forma exponencial. O declive da recta foi tanto mais acentuado quanto maior a temperatura de inactivação. No entanto, a 34°C o declive não está de acordo com o esperado, pois apresenta um valor mais elevado em relação à temperatura de 36°C.

Não se verificaram efeitos significativos da temperatura até aos 20 minutos de incubação a 34°C, sendo assim, a inactivação só foi mensurável a partir deste tempo altura em que a percentagem de sobrevivência começou a descer de uma forma linear, ao longo do tempo. Nas outras temperaturas, a inactivação iniciou-se mais cedo, aproximadamente 10 minutos para 36°C e 38°C e menos de 3 minutos para 40°C.

A 34°C e 38°C apareceram caudas nas curvas de sobrevivência indicando que a estas temperaturas existe população que se mantém viável após a fase de morte exponencial até ao fim da experiência. Os valores destas caudas não foram utilizados no

cálculo do declive. Com base nos declives das rectas determinaram-se os valores de D, entre as temperaturas de 34°C e 40°C (tabela 3.1)

Saccharomyces ludwigii ISA 1108

A figura 3.2 representa a variação da viabilidade celular, em diferentes temperaturas, para a levedura *S. ludwigii* ISA1108, no vinho tinto.

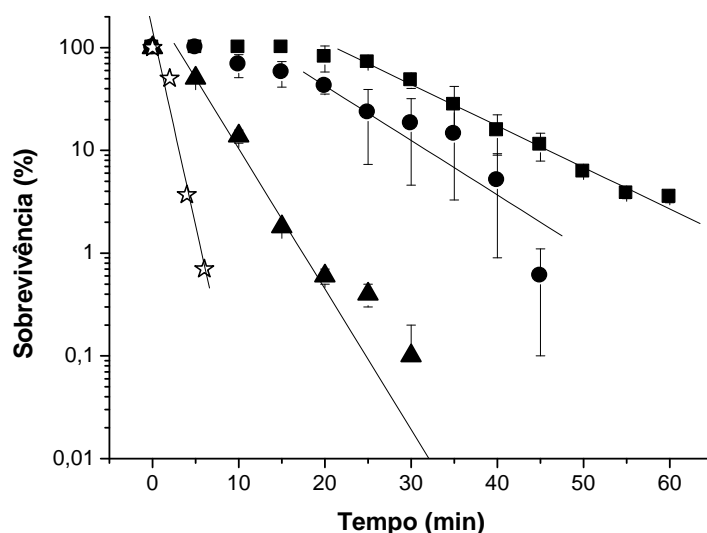


Figura 3. 2. Curva de sobrevivência de *Saccharomyces ludwigii* ISA 1108, em vinho tinto (pH=3,5, 12% de etanol) a 34°C (■), 36°C (●), 38°C (▲) e 40°C (★).

Observou-se uma fase inicial sem perda de viabilidade, tanto mais reduzida quanto maior a temperatura. Após, o decréscimo de viabilidade ocorreu de forma exponencial. O declive da recta foi tanto mais acentuado quanto maior a temperatura de inativação. Nos primeiros 20 minutos de incubação, não foram verificados efeitos significativos para a temperatura de 34°C. Nas outras temperaturas a inativação iniciou-se mais cedo, aproximadamente 10 minutos para 36°C e 38°C e menos de 3 minutos para 40°C.

A 34°C evidenciou-se o aparecimento de uma cauda indicando que a esta temperatura existe população que se mantém viável após a fase de morte exponencial até ao fim da experiência. Com base nos declives das rectas determinaram-se os valores de D, entre as temperaturas de 34°C e 40°C (tabela 3.1)

Schizosaccharomyces pombe ISA 1190

A variação da viabilidade celular a diferentes temperaturas de incubação, na levedura *S. pombe* ISA1190, está representada na figura 3.3.

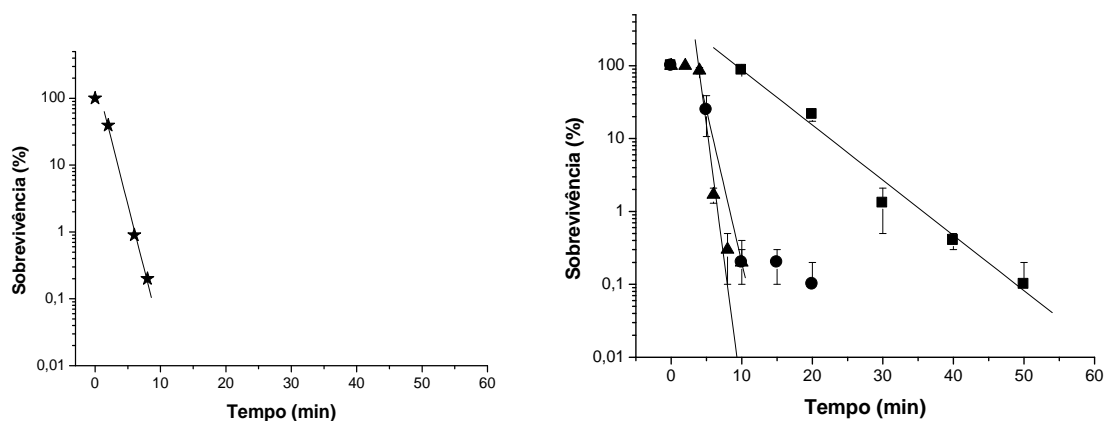


Figura 3. 3. Curvas de sobrevivência de *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190, em vinho tinto (pH=3,5, 12% de etanol) a 36°C (■), 38°C (●), 40°C (▲) e 42°C (★).

Observou-se uma fase inicial sem perda de viabilidade, tanto mais reduzida quanto maior a temperatura, após a qual a morte o decréscimo de viabilidade ocorreu de forma exponencial.

À temperatura de 40°C observou-se um patamar no início da curva, pelo que seria de esperar que para uma temperatura inferior a 38°C, observar-se também um patamar à semelhança do que se observou para a *S. cerevisiae* e *S. ludwigii*. Se o ensaio fosse prolongado certamente seria visível o patamar no fim da curva correspondente à temperatura de 36°C, como se observou para 38°C.

O declive da recta foi tanto mais acentuado quanto maior a temperatura de inativação. Não se verificaram efeitos significativos da temperatura até aos 10 minutos de incubação a 36°C. Nas restantes temperaturas, a inativação iniciou-se mais cedo, aproximadamente menos de 3 minutos a 40°C e, imediatamente após a inoculação, para 38°C e para 42°C.

As curvas, assim como os valores de D, nas temperaturas 36°C e 38°C são relativamente afastadas, pelo que deveria ter sido realizado um ensaio a uma temperatura intermédia de 37°C. Com base nos declives das rectas determinou-se os valores de D, entre as temperaturas de 36°C e 42°C (tabela 3.1).

Zygosaccharomyces bailii ISA 2270

A variação da viabilidade celular, a diferentes temperaturas, na levedura *Z. bailii* ISA 2211, em vinho tinto, está representada na figura 3.4.

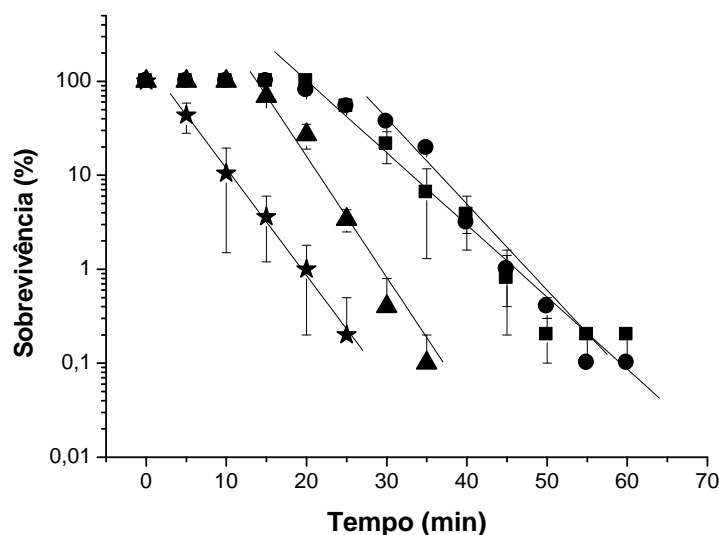


Figura 3.4. Curva de sobrevivência de *Zygosaccharomyces bailii* ISA 2270, vinho tinto (pH=3,5, 12% de etanol) a 34°C (■), 36°C (●), 38°C (▲) e 40°C (★).

Observou-se uma fase inicial sem perda de viabilidade, tanto mais reduzida quanto maior a temperatura. Após, a viabilidade diminuiu de uma forma exponencial. O declive da recta foi tanto mais acentuado quanto maior a temperatura de inactivação, sendo que para a temperatura de 40°C o declive não está de acordo com o esperado, apresentando um declive menos acentuado em relação aos 38°C. Não se verificaram efeitos significativos da temperatura até aos 20 minutos de incubação a 34 e 36°C. Nas restantes temperaturas a inactivação iniciou-se mais cedo, aproximadamente 10 minutos para 38°C e, imediatamente após a inoculação, para 40°C.

Nas temperaturas de 34°C e 36°C observou-se patamares semelhantes embora fosse de esperar, que para uma temperatura inferior a 34°C, se observa-se um patamar maior à semelhança do que se observou para a *S. cerevisiae* e *S. ludwigii*.

Com base nos declives das rectas determinou-se os valores de D, entre as temperaturas de 34°C e 40°C (tabela 3.1).

Dekkera bruxellensis ISA 2211

A viabilidade celular, ao longo do tempo de incubação, para diferentes temperaturas, na levedura *D. bruxellensis* ISA 2211, em vinho tinto, está representada na figura 3.5.

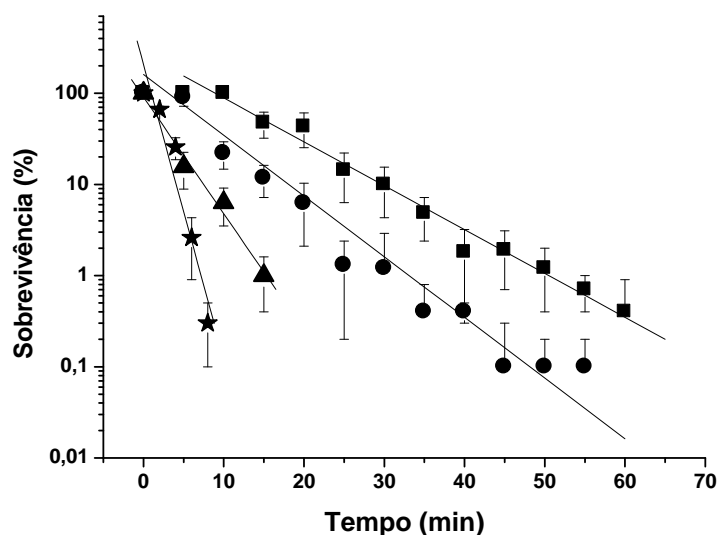


Figura 3.5. Curva de sobrevivência de *Dekkera bruxellensis* ISA 2211, em vinho tinto (pH=3,5, 12% de etanol) a 30°C (■), 32°C (●), 34°C (▲) e 36°C (★).

Observou-se uma fase inicial sem perda de viabilidade, tanto mais reduzida quanto maior a temperatura. De seguida o decréscimo de viabilidade ocorreu de forma exponencial.

O declive da recta foi tanto mais acentuado quanto maior a temperatura de inactivação, de acordo com o esperado. Não se verificaram efeitos significativos da temperatura até aos 10 minutos de incubação a 34°C. Nas outras temperaturas a inactivação iniciou-se mais cedo, aproximadamente 5 minutos para 36°C e, imediatamente após a inoculação, para 38°C e 40°C.

Às temperaturas de 38°C e 40°C observou-se que não existem patamares mas, era de esperar, que para uma temperatura inferior de 38°C, observar-se um patamar à semelhança do que se observou para a *S. ludwigii*. Com base nos declives das rectas determinou-se os valores de D, entre as temperaturas de 30 e 36°C (tabela 3.1).

3.2. Determinação do valor de Z

Os valores de D em função das temperaturas (figura 3.6), permitiram obter o valor de Z para cada estirpe (tabela 3.1). Como era esperado, os valores de D diminuíram à medida que a temperatura aumentou. Determinados valores foram retirados arbitrariamente do cálculo de Z, pois aparentavam não estar de acordo com a redução linear dos valores de D.

Para as estirpes estudadas, através do valor de Z, pode-se observar que a estirpe com maior resistência térmica, ou seja, a que é necessária maior temperatura para reduzir um patamar logarítmico no valor de D, foi *Z. bailli* ISA 2270, com um valor de 17,5°C. Contudo, trata-se um valor três vezes superior ao registado normalmente para células vegetativas (5°C). Em relação às restantes estirpes os valores de Z calculados são aproximadamente 5°C, como era de esperar. Apesar da espécie *D. bruxellensis* ter apresentado um valor de Z de 7,3°C, a temperatura de inativação foi mais baixa (30°C a 36°C), o que indica uma maior sensibilidade térmica.

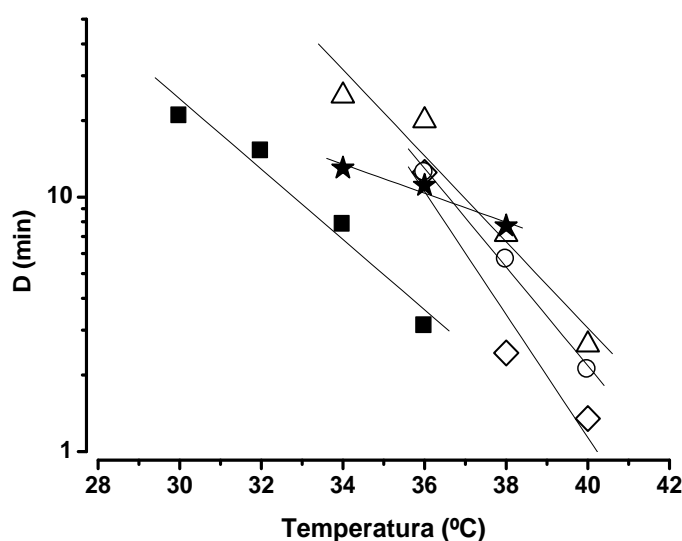


Figura 3.6. Curvas de morte térmica, das cinco estirpes de leveduras estudadas, em função da temperatura, em vinho tinto (pH=3,5, 12% de etanol) *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000 (○), *Saccharomycodes ludwigii* ISA 1108 (△), *Schizosaccharomyces pombe* ISA 1190 (◇), *Zygosaccharomyces bailli* ISA 2270 (★) e *Dekkera bruxellensis* ISA 2211 (■).

Tabela 3. 1. Tempos de redução Decimal (D) e valores de Z determinados em vinho Tinto (pH=3,5), na fase exponencial de crescimento.

Estirpe	Temperatura (°C)	D (min)	Z (°C)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000	34.0	<u>9.3</u> ($r^2=0.99$)	5.2 ($r^2=0.96$)
	36.0	12.5 ($r^2=0.98$)	
	38.0	5.7 ($r^2=0.97$)	
	40.0	2.1 ($r^2=0.99$)	
<i>Saccharomyces ludwigii</i> ISA 1108	34.0	25.0 ($r^2=0.99$)	5.9 ($r^2=0.94$)
	36.0	20.0 ($r^2=0.89$)	
	38.0	7.14 ($r^2=0.99$)	
	40.0	2.63 ($r^2=0.96$)	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190	36.0	12.5 ($r^2=0.99$)	4.2 ($r^2=0.93$)
	38.0	2.4 ($r^2=1.00$)	
	40.0	1.4 ($r^2=0.95$)	
	42.0	<u>2.5</u> ($r^2=0.99$)	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270	34.0	13.0 ($r^2=0.96$)	17.5 ($r^2=0.00$)
	36.0	11.11 ($r^2=0.94$)	
	38.0	7.69 ($r^2=0.97$)	
	40.0	<u>9.09</u> ($r^2=0.99$)	
<i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211	30.0	20.83 ($r^2=0.98$)	7.25 ($r^2=0.96$)
	32.0	15.15 ($r^2=0.98$)	
	34.0	7.81 ($r^2=0.98$)	
	36.0	3.12 ($r^2=0.93$)	

Nota: Os valores sublinhados representam valores de D que foram retirados das rectas do gráfico de resistência térmica (valores de Z), Figura 3.4.

3.3. Determinação dos valores de D_{60} , $6D_{60}$, UP_{60} e $150UP_{60}$

Segundo a equação do ponto 2.5.1. calculou-se o valor D_{60} para seis potências de dez (tempo necessário para destruir a quantidade de microrganismos para uma pasteurização). Através deste valor, calculou-se o coeficiente, pela equação do ponto 2.5.2., para cada levedura e que foi utilizado no cálculo de UP_{60} nas várias temperaturas. Os resultados estão representados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Tempos de redução Decimal (D) a uma temperatura de 60°C, em uma e em seis potências de dez, e os coeficientes para o cálculo de UP_{60} entre as temperaturas de 60 e 90°C

Levedura	T (°C)	D_{60} (min)	$6xD_{60}$ (min)	Coeficiente	UP 60
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000	60	0,13	0,78	$1,557^0$	1,00
	62			$1,557^2$	2,42
	64			$1,557^4$	5,88
	66			$1,557^6$	14,25
	68			$1,557^8$	34,54
	70			$1,557^{10}$	83,73
	72			$1,557^{12}$	202,98
	74			$1,557^{14}$	492,09
	76			$1,557^{16}$	1192,94
	78			$1,557^{18}$	2891,98
	80			$1,557^{20}$	7010,88
	82			$1,557^{22}$	16996,11
	84			$1,557^{24}$	41202,80
	86			$1,557^{26}$	99885,84
	88			$1,557^{28}$	242148,15
	90			$1,557^{30}$	587027,41
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ISA 1108	60	0,22	1,32	$1,478^0$	1,00
	62			$1,478^2$	2,18
	64			$1,478^4$	4,77
	66			$1,478^6$	10,42
	68			$1,478^8$	22,77
	70			$1,478^{10}$	49,74
	72			$1,478^{12}$	108,67
	74			$1,478^{14}$	237,38
	76			$1,478^{16}$	518,55
	78			$1,478^{18}$	1132,76
	80			$1,478^{20}$	2474,51
	82			$1,478^{22}$	5405,52
	84			$1,478^{24}$	11808,27
	86			$1,478^{26}$	25794,99
	88			$1,478^{28}$	56348,73
	90			$1,478^{30}$	123092,91
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190	60	0,04	0,24	$1,731^0$	1,00
	62			$1,731^2$	3,00

Inactivação térmica de diferentes espécies de leveduras de alteração de vinhos

	64			1,731 ⁴	8,98
	66			1,731 ⁶	26,90
	68			1,731 ⁸	80,61
	70			1,731 ¹⁰	241,53
	72			1,731 ¹²	723,71
	74			1,731 ¹⁴	2168,50
	76			1,731 ¹⁶	6497,60
	78			1,731 ¹⁸	19469,16
	80			1,731 ²⁰	58336,63
	82			1,731 ²²	174797,61
	84			1,731 ²⁴	523756,75
	86			1,731 ²⁶	1569364,28
	88			1,731 ²⁸	4702381,94
	90			1,731 ³⁰	14090033,84
<i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211	60	0,33	1,96	1,375 ⁰	1,00
	62			1,375 ²	1,89
	64			1,375 ⁴	3,57
	66			1,375 ⁶	6,76
	68			1,375 ⁸	12,78
	70			1,375 ¹⁰	24,16
	72			1,375 ¹²	45,67
	74			1,375 ¹⁴	86,35
	76			1,375 ¹⁶	163,25
	78			1,375 ¹⁸	308,64
	80			1,375 ²⁰	583,52
	82			1,375 ²²	1103,21
	84			1,375 ²⁴	2085,76
	86			1,375 ²⁶	3943,39
	88			1,375 ²⁸	7455,48
	90			1,375 ³⁰	14095,51
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270	60	2,82	16,91	1,141 ⁰	1,00
	62			1,141 ²	1,30
	64			1,141 ⁴	1,69
	66			1,141 ⁶	2,21
	68			1,141 ⁸	2,87
	70			1,141 ¹⁰	3,74
	72			1,141 ¹²	4,87
	74			1,141 ¹⁴	6,34
	76			1,141 ¹⁶	8,25
	78			1,141 ¹⁸	10,74
	80			1,141 ²⁰	13,99
	82			1,141 ²²	18,21
	84			1,141 ²⁴	23,71
	86			1,141 ¹⁶	30,86
	88			1,141 ²⁸	40,18
	90			1,141 ³⁰	52,31

Segundo Brugirard e Rochard (1991), a pasteurização industrial no vinho é feita com aproximadamente 150UP60. Desta forma, é importante na parte tecnológica existirem tabelas de apoio que indiquem tempos e temperaturas necessários à pasteurização a 150UP60, mostrando rapidamente os valores aconselhados para a destruição microbiológica, a nível de adega. A tabela para as leveduras estudadas está representada abaixo (Tabela 3.3.) em semelhança à tabela apresentada por Brugirard e Rochard (1991).

Tabela 3.3. Tempo necessário para atingir uma inativação de aproximadamente 150UP60 entre as temperaturas de 70 e 80°C.

Levedura	T (°C)	UP60 Total	Tempo (s)	UP60~150
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISA 1000 (Z=5,2)	70	84	107	149
	72	203	45	152
	74	492	19	156
	76	1193	8	159
	78	2892	4	193
	80	7011	2	234
<i>Saccharomycodes ludwigii</i> ISA 1108 (Z=5,9)	70	50	181	150
	72	109	83	150
	74	237	38	150
	76	519	18	156
	78	1133	8	151
	80	2475	4	165
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ISA 1190 (Z=4,2)	70	242	38	153
	72	724	13	157
	74	2168	5	181
	76	6498	2	217
	78	19469	1	324
	80	58337	1	972
<i>Dekkera bruxellensis</i> ISA 2211 (Z=7,25)	70	24	373	150
	72	46	197	150
	74	86	105	151
	76	163	56	152
	78	309	30	154
	80	584	16	156
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ISA 2270 (Z=17,5)	70	4	2407	150
	72	5	1849	150
	74	6	1420	150
	76	8	1091	150
	78	11	838	150
	80	14	644	150

Para temperaturas superiores a 80°C o tempo de inativação tende para valores inferiores a 1 segundo, demonstrando que em poucos segundos a temperaturas altas é possível obter a inativação pretendida, com excepção da levedura *Zygosaccharomyces bailii* devido à sua elevada resistência térmica.

4. Conclusões

O controlo e a eliminação de contaminações microbianas a nível de adega é feita recorrendo a processos como a filtração e tratamentos térmicos ou à adição de conservantes (e. g. SO₂, DMDC, ácido sórbico). Em face das tendências actuais de consumo, tem-se vindo a assistir a uma redução nas doses de conservantes químicos utilizadas pelo que se têm procurado alternativas para a estabilização microbiológica dos vinhos. O tratamento por processos térmicos é uma das tecnologias mais utilizadas na indústria alimentar mas de limitada aplicação nos vinhos devidos a eventuais efeitos negativos na qualidade dos vinhos. No entanto, é talvez a opção mais eficaz no engarrafamento de vinhos com teor de açúcar residual. Por outro lado, o aperfeiçoamento tecnológico dos processos térmicos tem permitido minimizar as alterações indesejáveis no aroma e sabor dos vinhos. Desta forma, justifica-se uma actualização dos conhecimentos relacionados com a inactivação térmica de leveduras de forma a dimensionar correctamente os processos a nível industrial.

O presente trabalho permitiu obter dados relacionados com os parâmetros de morte térmica de leveduras e insere-se num projecto mais vasto de caracterização do efeito da temperatura sobre os microrganismos e as características organolépticas dos vinhos.

Os valores obtidos para as principais leveduras de alteração de vinhos confirmaram os valores esperados para os valores de D e de Z. No entanto, os valores obtidos para a espécie com maior resistência térmica (*Z. bailii*, Z= 17,5°C), são anormalmente elevados justificando a sua confirmação em trabalhos futuros. Em conjunto, verificou-se que a estirpe de *D. bruxellensis* apresentou uma gama mais baixa de temperaturas de inactivação, entre 30 (D = 20,8 min) e 36°C (D = 3,1 min), o que é bastante conveniente em termos tecnológicos na prevenção do defeito a “suor de cavalo”. Importa verificar se esta sensibilidade a temperaturas baixas é característica da espécie, para tal, será necessário testar a sensibilidade à temperatura noutras estirpes encontradas em adega.

Em termos de dimensionamento de processos os resultados permitiram demonstrar que a utilização de temperaturas de 80 a 90°C permite reduzir o tempo de tratamento a poucos segundos. Em estudos futuros, será interessante verificar se estes tempos são inócuos para a qualidade dos vinhos. Por outro lado, dever-se-á avaliar o efeito da composição do vinho na resistência térmica dos microrganismos, pois é de admitir que esta varie em função do etanol, pH, concentrações de açúcar e de conservantes ácidos.

5. Bibliografia

- Adams, M.R., Moss, M.O. (1995). Food Microbiology, The Royal Society of Chemistry, pp. 479.
- Alguacil, M., Fidalgo, M., Jiménez, J., Lozano, J.I., Neva, M.A. and Perdignes, F. (1998). Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en instalaciones de vendimiamediante PCR. Alimentacion, Equipos y Tecnología, 10: 81-85.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G. (2012). Inactivation Kinetics of *Salmonella* spp. Under thermal and emerging treatments: Food Research International. A review, 45: 700-712.
- Boekhout, T., Robert, V., Smith, M., Stalpers, J., Yarrow, D., Boer, P., Gijswijt, G., Kurtzman, C., Fell, J., Guého, E., Guillot, J. e Roberts, I. (2002). Yeasts of the World – Morphology, physiology, sequences and identification. CD-ROM from ETI Information Services, Ltd., Wokingham, UK.
- Boulton, B.R., Singleton, V.L., Bisson, L.F. e Kunkee, R.E. (1996). Principles and Practices of Winemaking. Chapman and Hall, New York.
- Brugirard, A., Rochard, J. (1991). Aspects pratiques des traitements thermiques des vins. Avenir Œnologie, pp. 130-190.
- Chatonnet, P., Boidron, J., Dubourdieu, D. (1993). Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur le teneur en acide acétique et en ethylphenols. J. Int. Sc. Vigne Vin, 27: 277-298.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., Pons, M. (1992). The Origin of Ethylphenols in Wines. J. Sci. Food Agric., 60: 165-178.
- Connel, L., Stender, H. e Edwards, C.G. (2002). Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. Am. J. Enol. Vitic., 53: 322-324.
- Couto, A.C., Neves, F., Campos, F., Hogg, T. (2005). Thermal Inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. Internacional Journal of Food Microbiology, 104: 337-344.
- Deak, T., Beuchat, L.R. (1996). Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Raton, USA.

- Deak, T., Reichart, O. (1986). Unacceptable levels of yeasts in bottled wine. In: A. King, J. Pitt, L. Beuchat and J. Corry (editors), *Methods for the Mycological Examination of Food*.
- Delfini, C. (1988). Refermentation Potential in Bottled Sweet Wines of Yeasts Adapted to Sulfur Dioxide. *Chem. Mikrobiol. Technol.*, 11: 137-142.
- Delfini, C., Formica, J.V. (2001). *Wine Microbiology: Science and Technology*, Marcel Dekker, Inc., pp. 67-191 e 425-431.
- Deveze, M., Ribereau-Gayon, P. (1977). Thermoresistance de Levures dans le vin, *Connaissance Vigne et Vin*, 11: 131-163.
- Donnelly, D.M. (1997). Airborne microbial contamination in winery bottling room. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28: 176-181.
- Esch, F. (1992). Yeast in Soft Drinks and Concentrated Fruit Juices. *Brygmesteren*, 4 : 9-20.
- Ezequiel, M.R. (2010). Efeitos na composição Físico-Química e análise sensorial, Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Viticultura e Enologia, pp. 64.
- Fleet, G.H., Querol, A. (1992). *Yeasts in Food and Beverages*, Springer, pp. 459.
- Fugelsang, K.C. (1997). *Wine Microbiology*, Springer, pp. 245.
- Francis, I.L., Sefton, M.A., Williams, P.J. (1994). The sensory effects of prefermentation or postfermentation thermal-processing on Chardonnay and Semillon wines. *American journal of Enology and viticulture*, 45: 243-251.
- Henriette, M.C., Put e J. De Jong (1981). Heat resistance studies of Yeasts; vegetative cells versus ascospores. *Journal of Applied Bacteriology*, 53: 73-79.
- Jermini, M.F.J., Schimidt-Lorenz, W. (1987). Heat Resistance of Vegetative Cells and Asci of Two *Zygosaccharomyces* Yeasts in Broths at Different Water Activity Values. *Journal of Food Protection*, 50: 835-841.
- Kunkee, R. e Bisson, L. (1993). Wine-making yeasts. In: A. H. Rose and J. S. Harrison (editors), *The Yeasts* (vol. 5, 2nd ed.). Academic Press, London, pp. 69-127.
- Leão, C., Van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 1581-1590.

- Loureiro, V.B. (1984). Toxicidade do Etanol em Leveduras: efeitos sobre o crescimento e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertação de Doutorado, apresentada ao Instituto Superior de Agronomia.
- Malfeito-Ferreira, M. (2010). Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. Springer-Verlag and the University of Milan, 61: 95-102.
- Malfeito-Ferreira, M., Lopes, J. e Loureiro, V. (1989). Infecting yeasts in Portuguese bottled white-wines. Proceedings of the XIIIth International Symposium on Yeasts. Leuven, Belgium.
- Minarik, E. (1983). Levures de contamination du vin embouteillé. Bull. O.I.V. , 56: 414-419.
- Neradt, F. (1982). Sources of Reinfections During Cold-Sterile Bottling of Wine. Am. J. Enol. Vitic., 33: 140-144.
- Peynaud, E. and Domercq, S. (1955). Sur les especes de levures fermentant selectivement le fructose. Ann. Inst. Pasteur, 89: 346-351.
- Pinto, I., Cardoso, H., Leão, C., Van Uden, N. (1989). High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induce by acetic acid. Biothenol. Bioeng, 33: 1350-1352.
- Pitt, J.I. e Hocking, A.D. (1985). Fungi and Food Spoilage. Academic Press, Sydney, Australia.
- Poulard, A. (1978). Étude des contaminations microbiologiques à l'embouteillage des vins blancs du pays nantais. Vignes Vins, 267: 25-28.
- Rankine, B.C. e Pilone, D.A. (1973). *Saccharomyces bailii*, a resistant yeast causing serious spoilage of bottled table wine. Am. J. Enol. Vitic., 24: 55-58.
- Sa-Correia, I., Van Uden, N. (1986). Ethanol-Induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. Biotechnol Bioeng, 28:301-303.
- Sponholz, W.F. (1992). Wine Spoilage by Microorganisms. In: G.H. Fleet (editor), Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, pp. 395-419.
- Thomas, D.S. (1993). Yeasts as Spoilage Organisms in Beverages. In: A.H. Rose and J.S. Harrison (editors), The Yeasts (vol. 5, 2nd edition). Academic Press, London, pp. 517-561.

- Thomas, D.S. and Davenport, R.R. (1985). *Z. bailii* – a profile of characteristics and spoilage activities. Food Microbiol., 2: 157-169.
- Toit, M., Pretorius, I.S. (2000). Microbial Spoilage and Preservation of Wine: Using weapons from nature's Own Arsenal – A review. Institute for wine Biotechnology and Department of Viticulture & Oenology, South Africa.
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M. (2010). Susceptibility of wine spoilage yeast and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. Springer-Verlag and the University of Milan, 60: 549-556.
- Van der Walt, J.P. and van der Kerken, A.E. (1958). The wine yeast of the cape. Part I - A taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. Antoine Van Leeuwenhoek, 24: 239-252.
- Van der Walt, J.P. and van der Kerken, A.E. (1961). The Wine Yeasts of The Cape Part V – Studies on the occurrence of *Brettanomyces intermediu* and *Brettanomyces schanderlii*. Antonie van Leeuwenhoek, 27: 81-90.
- Van Uden, N.(1984). Temperature Profiles of Yeasts. laboratory of Microbiology, Gulbenkian Institute of Science, Portugal. pp. 195-248.
- Van Uden, N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance. Ann Reports on Fermentation Process, 8: 21-90.
- Wium, H., Malfeito-Ferreira, M., St. Aubyn A. and Loureiro, V. (1990). Rapid characterization of yeasts contaminants associated with sparkling wine production. Industrie de Ile Bevande, 19: 504-506.

5. Anexos

Anexo I

Composição do meio GYP sólido com Cloranfenicol (para 1L)

Componentes	Quantidade (g)
Extracto de levedura	5
Peptona	5
Glucose	20
Agar- Agar	20
Água Desmineralizada	1000 mL
Esterilização a 121°C, 15 min e arrefecimento em Banho de água a 50°C	
Solução de Cloranfenicol 100mg/mL	1mL

Composição do meio GYP líquido

Componentes	Quantidade (g)
Extracto de levedura	5
Peptona	5
Glucose	20
Água Desmineralizada	1000 mL
Esterilização a 121°C, 15 min e arrefecimento em Banho de água a 50°C	

Anexo II

Composição Inicial do vinho- Marca Brilho de Uva, 2011- Realizada a 20 de Agosto de 2012

Teor alcoólico a 20°C	12,3%
Acidez Total expressa em Ácido Tartárico	4,8 g/dm ³
Acidez volátil corrigida expresso em ácido acético	0,67 g/dm ³
pH	3,60
Anidrido Sulfuroso livre	28 mg/dm ³
Anidrido Sulfuroso Total	65 mg/dm ³
Açúcares	1,7 g/dm ³

Anexo III

Contagens, Cálculo da % de Sobrevivência, Média e Desvio Padrão.